



学習院大学理学部生命科学科 赤 沼 元 気

## 枯草菌リボソームの新たな機能に関する研究

## はじめに

リボソームは全ての生物に存在する複合体であり、生命活動に必須な翻訳機能を担うことから、古くから重要な研究対象として扱われてきた。これまで生化学的な解析が中心だったリボソーム研究において、筆者らはリボソームを構成するリボソームタンパク質を、主に分子遺伝学的手法を用いて新たな切り口から研究を展開してきた。そのなかで、リボソームと必須金属イオン ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) との関係や、リボソームタンパク質の必須性と多機能性に関する新しい知見を見出してきた。以下に各研究の概要を示す。

## 1. リボソームダイマー形成の生理的意義

## 1-1. 定常期におけるリボソームダイマー形成の意義

リボソームダイマーは70Sリボソームが2つ結合して形成される100Sの複合体であり、翻訳活性を持たない。多くのバクテリアにおいてリボソームダイマーの存在が確認されていたが、リボソームダイマー形成の生理的意義は不明だった。そのなかで筆者らは、枯草菌定常期におけるリボソームダイマー形成にHpfタンパク質が必須であることを示すと同時に、リボソームダイマー形成が定常期細胞のリボソームを安定化し、再増殖時の速やかな翻訳活性獲得に重要であることを見出した(図1)。

## 1-2. 孢子形成期におけるリボソームダイマー形成の意義

リボソームダイマーは、孢子をほとんど形成しない条件では再増殖時まで保存される。その一方で、孢子を形成する条件では、孢子形成初期に形成されたリボソームダイマーが、孢子形成過程で分解されることを見出した。リボソームが分解される時期は、孢子外殻を形成する時期と一致しており、枯草菌がリボソームの分解産物を孢子形成に再利用していると考えられる。

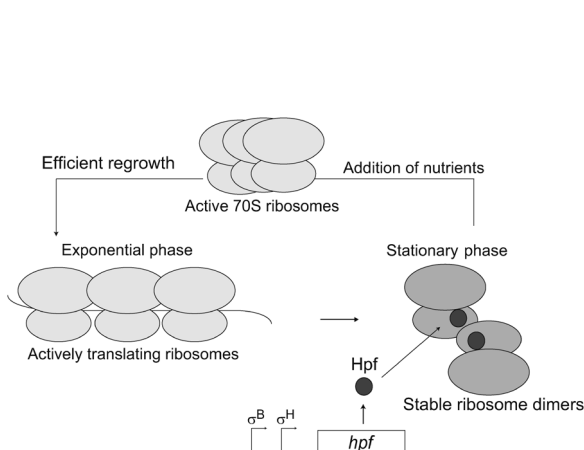


図1. 枯草菌リボソームダイマー形成の生理的意義  
定常期に形成されたリボソームダイマーは安定に維持され、再増殖時には速やかに活性型70Sに戻る

## 2. リボソームタンパク質機能の多様性

## 2-1. リボソームタンパク質遺伝子の網羅的遺伝子破壊

生命活動維持に必須な複合体を構成するタンパク質であることから、リボソームタンパク質遺伝子は基本的には必須と考えられてきた。このような背景のなか、筆者らは枯草菌ゲノムに57種存在するリボソームタンパク質遺伝子の網羅的な破壊を試み、実に22種ものリボソームタンパク質が増殖に非必須であることを証明した。また、L1, L22をコードする遺伝子の破壊株では孢子形成能が低下すること、及びS21をコードする遺伝子の破壊株では運動性が低下することを発見し、リボソームタンパク質が翻訳以外の機能に関与する可能性を示した。

## 2-2. リボソームタンパク質遺伝子への変異導入

遺伝子破壊実験の結果から増殖に必須であることが示されたリボソームタンパク質遺伝子に対しては点変異の導入を試み、その表現型を解析した。その結果、L2, L3, S10リボソームタンパク質への変異導入が70Sリボソーム形成や増殖速度のみならず、孢子形成にも影響を及ぼすことを見出した。

3. リボソームと  $Mg^{2+}$  の関係についての新たな発見3-1.  $Mg^{2+}$  によるリボソームタンパク質機能の相補

$Mg^{2+}$  はリボソームタンパク質とrRNAの結合や翻訳活性にも必須であり、リボソームに欠かせない金属イオンである。50Sリボソームサブユニットの構成タンパク質であるL34の欠損株では、70Sリボソーム形成量と増殖速度の低下が観察される。このような表現型を示すL34欠損株からサプレッサー変異株を単離、解析することで、細胞内 $Mg^{2+}$ 濃度の上昇が、L34欠損による70Sリボソーム形成異常を回復させることを発見した。驚くべきことに、 $Mg^{2+}$ 濃度の上昇はL34欠損の影響でリボソームから欠落していたL16のリボソームへの結合も回

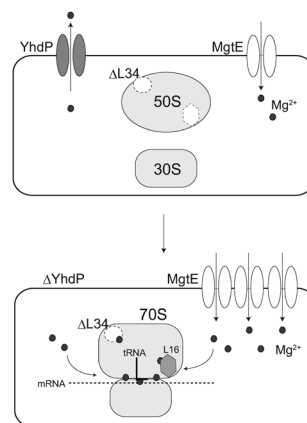


図2.  $Mg^{2+}$  によるリボソームタンパク質機能の相補  
 $Mg^{2+}$  importer (MgtE) の高発現と exporter (YhdP) の欠損による細胞内 $Mg^{2+}$ 濃度上昇はL34が欠損した50Sの構造を安定化する

復させた。この成果は、リボソームタンパク質の機能が  $Mg^{2+}$  によって相補可能であることを示した最初の例である (図2)。

さらに、L34以外のリボソームタンパク質 (L1, L23, L36, S6) の欠損による 70S リボソーム形成異常に関しても、 $Mg^{2+}$  濃度の上昇により回復することを証明し、 $Mg^{2+}$  によるリボソームタンパク質機能の相補が一般的であることを示した。

### 3.2. リボソームと細胞内 $Mg^{2+}$ 量の相関性

リボソームタンパク質欠損株の解析を行う中で、70S リボソーム量の少ない変異株では、細胞内  $Mg^{2+}$  量が低下していることに気付いた。70S リボソーム 1 分子には 170 原子以上の  $Mg^{2+}$  がキレートされることから、リボソーム量の低下が細胞内  $Mg^{2+}$  量の低下を引き起こすと考えた。これについて、枯草菌ゲノム上に 10 コピー存在する rRNA オペロンのコピー数を段階的に減少させた株、すなわち、リボソーム量を減少させた株を用いて証明し、細胞内のリボソーム量と  $Mg^{2+}$  の間に相関性があることを示した。

## 4. 細胞内 $Zn^{2+}$ 濃度変化で入れ替わるリボソームタンパク質

### 4.1. L31 のリボソームにおける入れ替わり

筆者らは枯草菌リボソームのタンパク質構成変動について検証し、世界で初めてリボソームにおいて入れ替わる 2 種の L31 リボソームタンパク質 (L31 と YtiA) を発見した。また、この入れ替わりが細胞内  $Zn^{2+}$  濃度の低下によって引き起こされることを見出し、その分子制御機構を解明した (図3)。細胞内に十分な  $Zn^{2+}$  が存在する場合、 $Zn^{2+}$  の結合により安定化した L31 がリボソームに結合する一方、活性型 (亜鉛結合型) Zur によって転写抑制を受ける *ytiA* は発現しない。しかし細胞内  $Zn^{2+}$  濃度が低下すると、安定性の低下した L31 が分解され、Zur による転写抑制が解除された YtiA が発現し、リボソームに結合するという機構である。さらに、リボソームへの結合親和性の高い YtiA の発現によって L31 がリボソームから追い出される形で遊離することを *in vivo*, *in vitro* の両面から証明するとともに、リボソームから遊離した L31 が  $Zn^{2+}$  を放出することで、必須金属イオンである  $Zn^{2+}$  が細胞に供給されることを提唱した。この成果は、リボソームが環境変化に適応するために、タンパク質の構成を変化させるという新しい概念を示すことになった。

### 4.2. リボソームタンパク質の亜鉛依存からの脱却

L31 と同様に、枯草菌には S14 が 2 種存在する。  $Zn^{2+}$  結合型 (C+型) の S14 と  $Zn^{2+}$  非結合型 (C-型) の YzhA である。YzhA は細胞内  $Zn^{2+}$  濃度が低下した際に発現し、リボソームに結合する。原始的な S14 は C+型であり、進化の過程で C-型の S14 が登場したと考えられている。タンパク質のサイズは C+型よりも C-型の方が大きいことから、S14 は 4 残基の  $Zn^{2+}$  結合モチーフを、数十残基のアミノ酸に置き換えることで、亜鉛依存からの脱却を図ったのではないかと予想している。そこで筆者らは、YzhA よりもさらにサイズが大きく、進化の過程では後発型と予想される大腸菌とシアノバクテリアの S14 をそれぞれ枯草菌の S14 と入れ替えることで、リボソームの進化過程を考察しようと試みた。作製したキメラリボソームの解析を行う中で、異種 S14 を含むリボソームでは枯草菌 S3 のリボソームに対する結合親和性が低下すること、及び異種 S14 が結合した枯草菌リボソームでのみ、異種 S3 が機能することが分った。これらの結果は、S14 の進化に伴い、S3 も

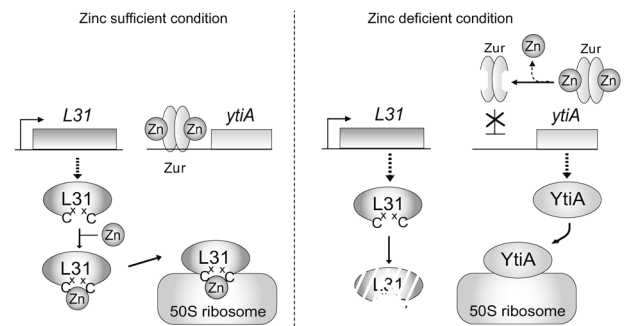


図3.  $Zn^{2+}$  濃度変化による L31 の入れ替わり

それに適応するために進化を遂げてきた可能性を強く示唆するものである。

おわりに

枯草菌リボソームを遺伝学的なアプローチから解析することで、リボソームが  $Zn^{2+}$  の貯蔵庫として機能するなど、リボソームの新たな機能を見出すことができた。細胞内に存在する  $Mg^{2+}$  の 25% はリボソームによってキレートされていると考えられており、今後の解析によってリボソームが  $Mg^{2+}$  の貯蔵庫として機能することも証明できるかもしれない。また、異種リボソームタンパク質の組込みによるキメラリボソームの作製と解析は、水平伝播などによって獲得した異種リボソームタンパク質を細胞がどのようにして受け入れてきたのか、いわばリボソームの進化を理解する上で有効な手段になると考えている。一方、リボソームタンパク質の人為的な入れ替えによる翻訳特異性の変換や、 $Mg^{2+}$  濃度操作によるリボソームの構造安定化は、これまでタンパク質異種発現のボトルネックとなっていた翻訳の効率を向上させる技術にもなり得る。今後も基礎と応用の両面で貢献できるように、リボソームを対象とした研究を進展させていきたい。

謝辞 本研究は、立教大学理学部生命科学科、及び中央大学理工学部応用化学科で行われたものです。本研究を始める機会を与えて頂き、学生時代から今日に至るまで、終始多大なご指導とご支援を賜りました立教大学名誉教授 河村富士夫先生に心から感謝申し上げます。また、丁寧なご指導を賜り、私に研究者の道を選択するきっかけを与えて下さいました福島県立医科大学准教授 七宮英晃先生に厚く御礼申し上げます。特別研究員時代には、東京大学教授 堀之内末治先生、同大学教授 大西康夫先生よりご指導を賜り、私の研究者としての礎を築くことができました。深く感謝致します。また、本研究を遂行する環境を整えて下さり、日頃より暖かいお言葉とご助言を頂きました立教大学教授 山田康之先生、中央大学教授 石塚盛雄先生、学習院大学教授 菱田卓先生に心から御礼申し上げます。全ての方のお名前を挙げることはできませんが、多くの共同研究者の先生方より貴重なご意見・ご助言を賜りました。皆様に御礼申し上げます。本研究の成果は、立教大学分子遺伝学研究室、タンパク質生物物理学研究室、ならびに中央大学応用生物化学研究室に在籍した多くの学生の努力の賜物であり、あらためて感謝の意を表します。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦下さいました河村富士夫先生にあらためて心から御礼申し上げます。